Isolierung der cysteinhaltigen tryptischen Peptide aus der a-Glycerophosphatdehydrogenase des Kaninchenmuskels im Nanomolmaßstab

Barbara Harbers

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546011_0086

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
und Physikalische Biochemie
der Universität München
Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. Theodor Bücher

Isolierung der cysteinhaltigen tryptischen Peptide aus der a-Glycerophosphatdehydrogenase des Kaninchenmuskels im Nanomolmaßstab

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Barbara Harbers
aus Amberg

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr.h.c. Bücher
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Braunitzer
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7.11.1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München in der Zeit von November 1968 bis August 1971 ausgeführt.

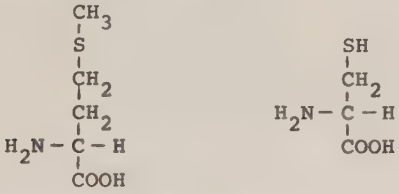
Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Theodor Bücher danke ich vielmals für die großzügige Förderung dieser Arbeit. Für die stetige Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Joachim Ótto und Herrn Dr. Werner Machleidt. Herzlichen Dank sage ich Frau Gerda Behrens für die zahlreichen Aminosäureanalysen.

Inhaltsverzeichnis

A		Einleitung	1
B		Methoden	5
	I	Reindarstellung der GDH	5
	II	SH-Gruppenbestimmung	6
	III	Umsetzung der GDH mit ^{14}C-N-Äthyl-maleinimid	7
	IV	Isolierung von Spaltstücken der ^{14}C-N-Äthylsuccinimid-substituierten GDH	8
	1	Tryptische Spaltung	8
	2	Trennung und Isolierung der tryptischen Peptide	8
		a Gelfiltration auf Sephadex G 25	10
		b Anionenaustauschchromatographie auf QAE-Sephadex	11
		c Entsalzung auf Sephadex G 10 und G 25 oder Biogel P2	13
		d Kationenaustauschchromatographie auf SP-Sephadex	14
	3	Aminosäureanalyse	15
C		Ergebnisse und Diskussion	17
D		Zusammenfassung	42
E		Verzeichnis der Abkürzungen	43
F		Literaturverzeichnis	44

A. Einleitung

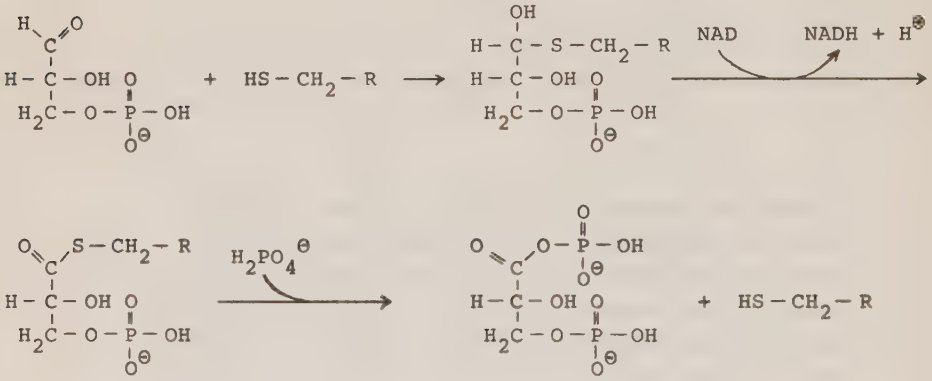
Von den zwanzig im genetischen Code determinierten Aminosäuren heben sich zwei durch den Gehalt an Schwefel hervor: das Methionin als ein Thioäther, das Cystein als ein Merkaptan.



Beide sind sowohl durch die Biosynthese als auch durch den Katabolismus eng miteinander verknüpft. Zwar ist die für den menschlichen Organismus essentielle Aminosäure Methionin als Methylgruppendonator ein wichtiger Metabolit, doch gibt es für die Funktion im Protein dieser oxidationsempfindlichen Aminosäure bisher kaum Beispiele: In Mikroorganismen wurde N-formyliertes Methionin als Startaminosäure bei der Proteinbiosynthese nachgewiesen (1), und im Cytochrom c ist Methionin mit einem freien Elektronenpaar des Schwefels an der Komplexierung des zentralen Eisens im Häm beteiligt (2).

Für das Cystein dagegen gibt es sowohl Funktionen, die zur Tertiärstruktur beitragen - durch Oxidation entstehen aus zwei Cysteinresten Disulfidbrücken, oder im Cytochrom c wird das Häm über zwei Thioäther kovalent an die Polypeptitkette gebunden - als auch Funktionen, die unmittelbar zur Enzymkatalyse beitragen, z.B. bei der Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (3) (EC. 1.2.1.12). Bei der Katalyse dieses Enzyms reagiert eines von vier Cysteinen pro Untereinheit (Schwein) mit dem Substrat D-Glycerinaldehydphosphat unter

Bildung eines Thiohalbacetals. Durch die Transhydrierung unter Beteiligung des Coenzyms NAD entsteht ein Thioester, der durch Phosphorylyse gespalten wird unter Bildung des gemischten Säureanhydrids 1.3-Diphosphoglycerinsäure und unter Regeneration der Merkaptogruppe des Cysteinrestes.



Auch bei anderen Dehydrogenasen hat man immer wieder vermutet, daß ein Cystein mit seiner Merkaptogruppe an der Katalyse beteiligt ist. Von mehreren Enzymen sind Peptide isoliert und sequenziert worden, die die "essentielle" oder die "reaktive" SH-Gruppe enthalten:

(siehe Tabelle I)

In der Tat erkennt man beim Vergleich dieser Sequenzen hohe Verwandschaftsgrade, die auf eine geringe Variationsbreite in der Umgebung dieses Cysteins schließen lassen. Und doch hat sich gezeigt, daß beispielsweise in der Alkoholdehydrogenase (EC. 1.1.1.27) keine SH-Gruppe an der Katalyse unmittelbar beteiligt ist.

(4)	LDH	Schwein - Herz, Muskel					Ile	Gly	Ser	Gly	Cys	Asn	Leu	Asp	Ser	Ala			
(5)		Hühner - Herz				Val	Ile	Ser	Gly	Gly	Cys	Asn	Leu	Asp	Thr	Ala	Arg		
(6)	ADH	Pferde - Leber		Met	Val	Ala	Thr	Gly	Ile	Cys	Arg	Ser	Asp	Asp	His				
(6)		Hefe				Tyr	Ser	Gly	Val	Cys	His	Thr	Asp	Leu	His	Ala			
(7)	GAPDH	Kaninchen - Muskel	Lys	Ile	Val	Ser	Asn	Ala	Ser	Cys	Thr	Thr	Asn	Cys	Leu	Ala			
(8)	GDH	Kaninchen - Muskel				Ala	Val	Asx	Thr	Cys	Ser	Gly	Glx	Gly	Ile				

Tabelle I: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Dehydrogenasen im Bereich des "reaktiven" Cysteins.

Von der GAPDH aus dem Schweinemuskel und aus dem Hummermuskel (9,10), von der ADH aus Pferdeleber (11) und von der GluDH vom Rind (12) sind die Primärstrukturen völlig bestimmt. Von der a-Glycerophosphatdehydrogenase (EC. 1.1.1.8.) aus Kaninchenmuskel sind ebenfalls Strukturuntersuchungen begonnen worden:
So gibt es von verschiedenen Autoren Untersuchungen über Untereinheiten (z.B. 13,14,15), Aminosäureanalysen (13,16,17,18) und SH-Gruppenbestimmungen (8, 13,15,19), die zum Teil stark variieren. Untersuchungen über den N-Terminus gibt es von van Eys (13) und Otto (15) und über den C-Terminus von Brosemer (14). Schließlich hat Otto (15) eine große Zahl von tryptischen Peptiden isoliert und analysiert und zum Teil auch sequenziert. Bei der Addition der Bruttoanalysen dieser Peptide werden von den neun Methioninen pro Untereinheit nur acht, von den zehn Cysteinen keines und von den beiden Tryptophanen ebenfalls keines erhalten.

In der vorliegenden Arbeit sollte diese Lücke möglichst aufgefüllt werden, ehe mit der Isolierung größerer Peptide für die Aufstellung der Partialsequenz begonnen wurde. Zunächst wurde für diese Untersuchungen noch einmal die Zahl der SH-Gruppen bestimmt. Nach der radioaktiven Markierung der SH-Gruppen und tryptischer Spaltung wurden die radioaktiven Peptide isoliert und analysiert. Bei dieser Arbeit fielen auch einige Peptide in reiner Form an, die kein Cystein oder Cysteinderivat enthalten. Schließlich wurden die beiden Tryptophanreste, die bei der Zusammenstellung von Otto ebenfalls fehlen, bestimmt.

B I. Reindarstellung der GDH

Nach den Untersuchungen von van Eys (20) sowie von Ankel und Bücher (19) enthält die GDH eine Komponente, die nicht aus Aminosäuren besteht. Ankel hat diese Komponente als Adenosindiphosphoribose - vermutlich ein Hydrolyseprodukt aus dem Coenzym NAD oder NADH - identifiziert. Dieses Nukleotid läßt sich durch Behandeln mit Aktivkohle abtrennen.
Durch die Chromatographie auf DEAE-Cellulose mit einem Na-Phosphat-Puffer-(pH 7,0)-Gradienten von 10 nach 70 mM läßt sich die GDH in eine nukleotidhaltige und eine nukleotidfreie Komponente zerlegen (15), die sich in ihrem UV-Absorptionsspektrum unterscheiden. Vor der Chromatographie kann man das Enzym mit Aktivkohle behandeln. Man erhält dann sofort ausschließlich die nukleotidfreie Komponente. Gegenüber der Kohlebehandlung allein hat die Chromatographie den Vorteil, daß man sicher ist, nur die nukleotidfreie Komponente zu haben. In dieser Arbeit wurde nur nach diesen Verfahren chromatographiertes nukleotidfreies Enzym verwendet.

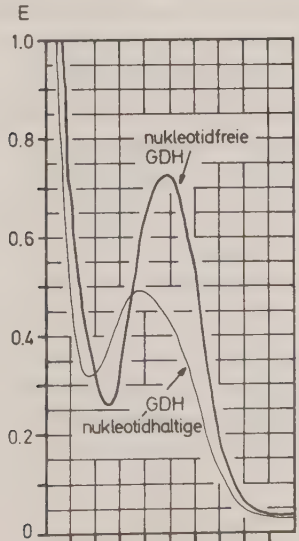


Abb. 1:

UV-Absorptionsspektren der nukleotidhaltigen und der nukleotidfreien GDH.

B II. SH-Gruppenbestimmung

Von verschiedenen Autoren ist die Zahl der SH-Gruppen bestimmt worden. Sie schwankt zwischen zwölf (8) und zwanzig (z.B. 15). Mit p-Merkuribenzoat fanden Ankel (19) 16 SH-Gruppen pro 75000 und van Eys (13) 11. Mit DTNB fanden van Eys nach der Methode von Ellman (13) 19 und Otto (15) 20.
Im Rahmen dieser Arbeit wurden die SH-Gruppen ebenfalls nach Ellman bestimmt. Dazu wurden Proben von GDH, die zunächst gegen Wasser dialysiert und anschließend bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurden, in 8 M Harnstoff gelöst. Die Ergebnisse von 8 Titrationen lagen zwischen 19 und 21 SH-Gruppen pro 75000. Die mangelnde Reproduzierbarkeit dieser Methode beruht in erster Linie auf der Ungenauigkeit der Einwaage. Aus dem bekannten Gehalt an Tryptophan und Tyrosin läßt sich die GDH-Menge nach der UV-Absorption bei 280 nm berechnen. Dabei wird ein konstantes Verhältnis von 5 für SH-Gruppen und Tryptophan bestimmt. Bei 4 Tryptophanen wird damit der Wert von 20 SH-Gruppen bestätigt.

Es wurde eine weitere Methode angewendet, um über die spezifische Radioaktivität nach Reaktion der Cysteinreste mit Jodacetamid oder mit N-Äthylmaleinimid die Zahl der SH-Gruppen zu bestimmen. Die Versuchsbedingungen sind unter B III auf Seite 7 beschrieben.

B III. Umsetzung der GDH mit ^{14}C-N-Äthylmaleinimid

Um die cysteinhaltigen tryptischen Peptide schnell und sicher aus dem Gemisch aller tryptischen Peptide isolieren zu können, wurde ein Reagenz gesucht, das möglichst spezifisch mit den SH-Gruppen reagiert, radioaktiv markierbar und unter den Bedingungen der tryptischen Spaltung, Peptidisolierung und salzsauren Hydrolyse stabil ist. Das im vorliegenden Fall verwendete ^{14}C-N-Äthylmaleinimid (^{14}C-NEM) war bisher vor allem zur Bestimmung reaktiver SH-Gruppen in nativen Enzymen benützt worden (Lit. Bei 21,22,23,24), wo es nicht immer quantitativ und langsam reagierte. Hier ist ^{14}C-NEM erstmalig zur Markierung aller SH-Gruppen am denaturierten Protein benützt worden und zwar, wie die nachfolgenden Ergebnisse zeigen, mit relativ großer Spezifität und guter quantitativer Ausbeute.

Zur Umsetzung wurde das Sediment einer Kristallsuspension nukleotidfreier GDH (siehe B I) in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 gelöst und der Proteingehalt mit dem Biuret-Reagenz (25) bestimmt. Zur Denaturierung des Proteins wurde Guanidiniumchlorid bis zu einer Molarität von 6 M zugegeben. Dann wurde unter Stickstoff ein zweifacher molarer Überschuß über die SH-Gruppen an Dithioerythrit (DTE) hinzugefügt, um die möglicherweise entstandenen Disulfidbrücken zu reduzieren (28). Die Umsetzung erfolgte anschließend durch dreimalige Zugabe von ^{14}C-NEM (Fa. The Radiochemical Centre Amersham) mit bekannter spezifischer Radioaktivität. Hierbei bestand ein zehnfacher molarer Überschuß über alle möglichen SH-Gruppen (GDH + DTE). Das Reaktionsgemisch wurde dann erschöpfend gegen 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer pH 8,6 dialysiert und anschließend lyophilisiert.

mg Protein	Mole GDH-Untereinheit	Vale SH-Gruppen	DTE/SH	NEM/DTE+SH
40	1×10^{-6}	10×10^{-6}	2	10

Tabelle II: Molverhältnisse bei der Umsetzung der SH-Gruppen

B IV. Isolierung von Spaltstücken der ^{14}C-N-Äthyl-succinimid-substituierten GDH

B IV 1. Tryptische Spaltung

Um einheitliche und reproduzierbare Bruchstücke der GDH zu erhalten, wurde wegen seiner hohen Spezifität Trypsin verwendet, das nur Lysyl- und Arginylbindungen hydrolysiert. Aus der Aminosäureanalyse sind dann maximal 10 cystein- und 2 tryptophanhaltige Peptide zu erwarten, wenn die GDH aus zwei identischen Untereinheiten besteht. Die Zahl der Peptide kann aber vermindert sein, wenn ein Peptid zwei oder mehrere dieser Aminosäuren enthält, oder vergrößert sein, wenn zusätzlich ditryptische oder durch unspezifische Spaltungen entstandene Peptide auftreten.
Die tryptische Spaltung erfolgte durch dreimalige Zugabe von 1 Gewichtsprozent Trypsin (DCC-Trypsin aus Rinderpankreas, Fa. Serva) bezogen auf die GDH bei 37°C in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer pH 8,6 in Abständen von 30 Minuten.

B IV 2. Trennung und Isolierung der tryptischen Peptide

Die Isolierung der Peptide erfolgte mit der von W. Mach-

leidt (27) entwickelten Methode zur automatischen Säulenchromatographie im Naomolmaßstab. Es wurden hierbei abwechselnd zwei verschiedene Chromatographieverfahren angewendet, und zwar die Gelfiltration auf Sephadex oder Biogel und die Ionenaustauschchromatographie auf Sephadex-Ionenaustauschern.

Die auf die Säulen aufgetragenen Peptidmengen betrugen durchschnittlich 10 - 200 nMol. Der Nachweis der Peptide in den Säuleneluaten erfolgte durch automatische Photometrie in Durchflußküvetten. Es wurde die Extinktion im Ultraviolett bei einer Wellenlänge von 224 nm gemessen. Die Absorption der Peptidbindung ist bei dieser Wellenlänge noch so groß (molarer Extinktionskoeffizient von 100 - 400 cm^2 x $mMol^{-1}$), daß alle Peptide angezeigt werden (Gilford-Spektralphotometer, Modell 2000 und Beckman-Spektralphotometer DU mit Wasserstofflampe, eigener Umbau). Zusätzlich wurden die Säuleneluate auch bei 280 und 289 nm photometriert (Photometer-Eppendorf mit Prismen-Monochromator und Wellenlängen- und Küvettenwechselautomatik), wobei Peptide mit Tryptophan und Tyrosin ermittelt werden. Die mit ^{14}C-NEM markierten cysteinhaltigen Peptide wurden entweder kontinuierlich mit Hilfe eines Durchfluß-szintillationszählers (ICN Tracerlab, Coruflow CMF-101) ermittelt, oder es wurde anschließend die Radioaktivität in einem Aliquot jeder Fraktion mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer 2002) bestimmt.
Das Säuleneluat wurde in halbstündigen Fraktionen von 180 µl (Austauscher) und 250 - 350 µl (Gelfiltration) gesammelt (Serva-Fraktionssammler Linear II) und anschließend im Exsikkator getrocknet. Die Gipfelfraktionen aus jedem Lauf wurden mit dreimal

200 µl Puffer zusammengespült (hierzu wurden die Plastikreaktionsgefäße und die automatischen Pipetten des Eppendorf-Mikrolitersystems, Fa. Eppendorf, Hamburg, verwendet).

B IV 2 a. Gelfiltration auf Sephadex G 25

Zur groben Vorfraktionierung des Peptidgemisches wurde Sephadex G 25 (Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt a.M.) verwendet. Die 100 cm langen und 4 mm weiten Säulen wurden bei Raumtemperatur mit einem flüchtigen 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer pH 8,6 eluiert bei einer Flußrate von 750 µl/h. Das Säuleneluat wurde bei 280 und 289 nm photometriert.

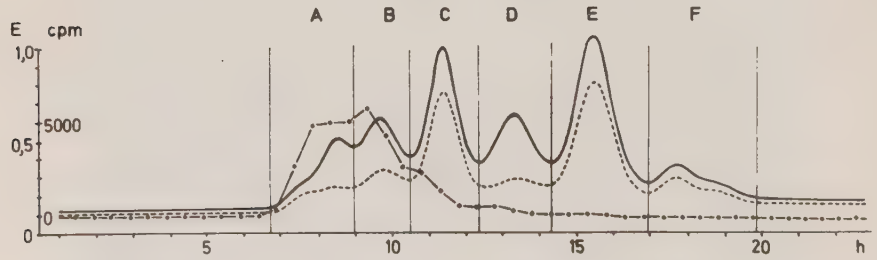


Abb. 2: Chromatogramm der tryptischen Peptide auf Sephadex G 25. ——— Extinktion bei 280 nm, ----- Extinktion bei 289 nm, —— Radioaktivität Imp./min.

Wie die dünnschichtchromatographische Analyse der Fraktionen A - E zeigt, enthalten die Fraktionen erwartungsgemäß nicht reine Peptide, sondern ein recht komplexes Gemisch verschiedener Peptide, von

denen die tryptophanhaltigen durch Anfärben mit p-Dimethylaminobenzaldehyd und die cysteinhaltigen aufgrund ihres ^{14}C-N-Äthylsuccinimidrestes mit Hilfe eines Dünnschicht-Scanners (Dünnschicht-Scanner II, Fa. Berthold, Bad Wildungen) lokalisiert werden konnten.

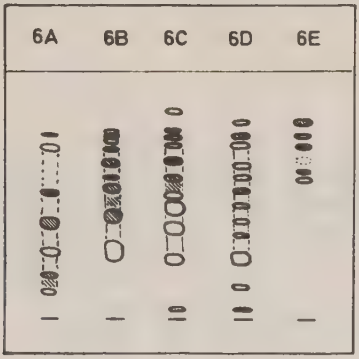


Abb. 3: Analytisches Dünnschichtchromatogramm der Sephadexfraktionen A bis E (Abb. 1). Kieselgel (Merck Fertigplatten), Chloroform/Methanol/ Ammoniak (25 %) 2:2:1 (v/v). Anfärbung mit Ninhydrin-Sprühreagenz. Schraffierte Banden: radioaktive Peptide; punktierte Banden: tryptophanhaltige Peptide.

B IV 2 b. Anionenaustauschchromatographie auf QAE-Sephadex

Zur weiteren Auftrennung der Fraktionen A bis E wurde der Anionenaustauscher QAE-Sephadex A 25 (Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt a.M.) verwendet, und zwar in Capillarsäulen von 100 cm Länge und einem Innendurchmesser von 1 mm. Zur Elution wurden 0,1 M Tris/ HCl-Puffer pH 8,6 und ein linearer NaCl-Gradient bis 0,5 M NaCl benützt (Abb. 4). Das Anfangsvolumen in der

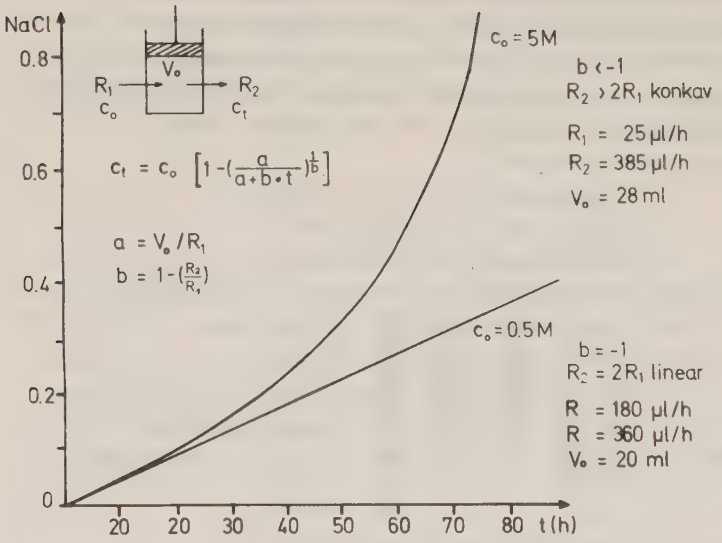


Abb. 4: Gradienten für die Peptidchromatographie am Anionenaustauscher QAE-Sephadex (linearer Gradient) und am Kationenaustauscher SP-Sephadex (konkaver Gradient). Abszisse: Zeit nach Elutionsbeginn in Stunden; Ordinate: NaCl-konzentration (Mol/l)

Mischflasche betrug hierbei 20 ml. Bei einer Flußrate von insgesamt 350 - 360 µl/h wurden im geschlossenen System 175 - 180 µl/h 0,1 M Tris/HCl-Puffer mit 0,5 M NaCl zugemischt. Die Extinktion des Säuleneluates wurde bei 224, 280 und 289 nm gemessen und die Radioaktivität nach der oben angegebenen Methode bestimmt.

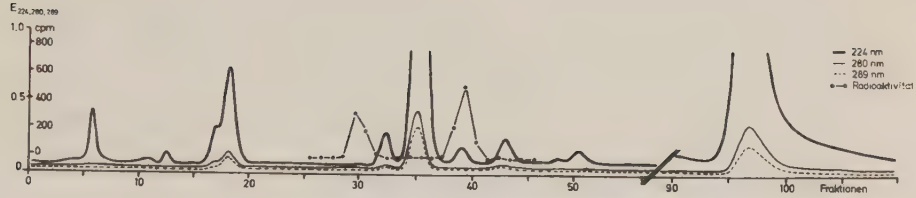


Abb. 5: Chromatogramm der tryptischen Peptide aus der Fraktion E der GDH auf QAE-Sephadex. Abszisse: Zahl der Fraktionen nach Elutionsbeginn (1 Fraktion = 30 min); Ordinate: Extinktion bei 224, 280 und 289 nm bzw. Radioaktivität in Imp./min. pro Fraktion.

B IV 2 c. Entsalzung auf Sephadex G 10 und G 25 oder Biogel P2.

Um den im Anionenaustauscherlauf verwendeten Tris-Puffer und das NaCl von den Peptiden abzutrennen wurde Sephadex G 10 und G 25 (Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt a.M.) oder Biogel P2 (Fa. Bio-Rad Laboratories, München-Gräfelfing) benützt. Sephadex G 10 hat einen Fraktionierbereich für Molekulargewichte zwischen 0 und 700, Biogel P2 zwischen 200 und 1800 und Sephadex G 25 zwischen 1000 und 5000. Bei richtiger Wahl des Gels wird neben der Entsalzung ein zusätzlicher Reinigungseffekt erzielt. Biogel P2 hat gegenüber Sephadex G 10 den Vorteil, Peptide, die aromatische Aminosäurereste enthalten, nicht oder nur geringfügig zu retinieren (26).
Säulenvolumen, Elutionsbedingungen, photometrische - und Radioaktivitätsmessungen waren die gleichen wie bei der Gelfiltration über Sephadex G 25 (siehe B IV 2 a).

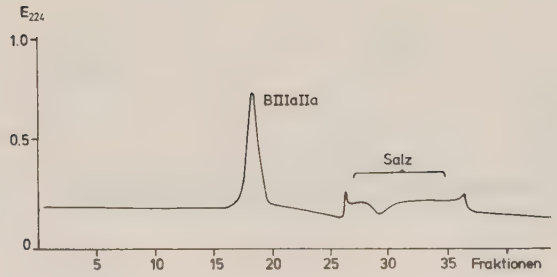


Abb. 6: Beispiel einer Entsalzung über Biogel P2. Abszisse: Zahl der Fraktionen nach Elutionsbeginn (1 Fraktion = 3o min); Ordinate: Extinktion bei 224 nm.

B IV 2 d. Kationenaustauschchromatographie auf SP-Sephadex.

Nach der Anionenaustauschchromatographie und der anschließenden Entsalzung wurde die Reinheit der Peptidfraktionen mit Hilfe der Aminosäureanalyse überprüft. Auf eine zusätzliche dünnschichtchromatographische Analyse wurde verzichtet, da für dieses Verfahren mindestens 5 - 10 nMol erforderlich sind, im Gegensatz zur Aminosäureanalyse, für die nur 0,5 - 1,0 nMol benötigt werden. Fraktionen, die nach der Aminosäureanalyse keine reinen Peptide enthielten, wurden über den Kationenaustauscher SP-Sephadex C 25 (Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt a.M.) rechromatographiert. Hierzu wurden, wie für den QAE-Sephadex A 25, Capillarsäulen von 100 cm Länge und 1 mm Innendurchmesser verwendet. Zur Elution wurde 0,05 M Phosphatpuffer pH 2,75 und ein konkaver Gradient bis 5 M NaCl benützt (siehe Abb 4 Seite 12). Das

Anfangsvolumen in der Mischflasche betrug 28 ml. Bei einer Flußrate von insgesamt 385 µl/h wurden 25 µl/h 0,05 M Phosphatpuffer mit 5 M NaCl zugemischt. Die Extinktion des Säuleneluates wurde bei 224, 280 und 289 nm gemessen und die Radioaktivität wie oben angegeben bestimmt.

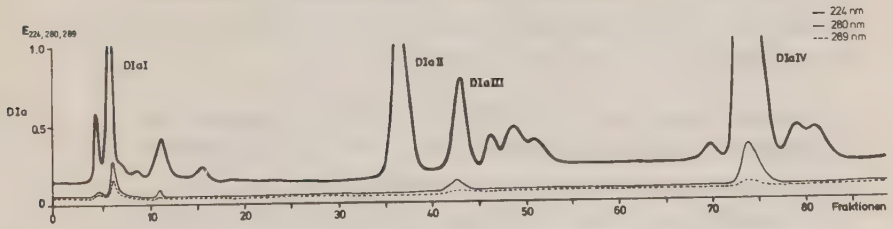


Abb. 7: Beispiel einer Rechromatographie auf SP-Sephadex. Abszisse: Zahl der Fraktionen nach Elutionsbeginn (1 Fraktion = 30 min); Ordinate: Extinktion bei 224, 280 und 289 nm.

B IV 3. Aminosäureanalyse

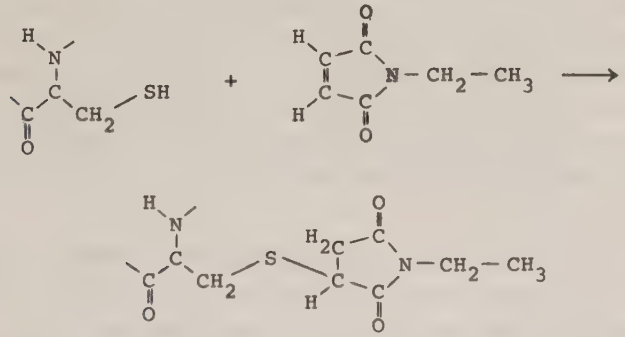
Die über Gelchromatographie "entsalzten" Peptide sind frei von nichtflüchtigen Ionen. Nach Eintrocknen im Exsiccator wirde das verbleibende Ammoniumhydrogencarbonat im gut evakuierten Exsiccator über konz. H_2SO_4 und festem NaOH absublimiert. Das erhaltene Peptid wird in 6 N HCl aufgenommen, mit Stickstoff durchperlt und im Wasserstrahlvakuum abgeschmolzen. Nach 24 Stunden Hydrolyse bei 110°C wird im Exsiccator über NaOH eingetrocknet und anschließend mit 50 mM Natriumzitrat-Puffer, pH 2,7, aufgenommen. Für die Bestimmung saurer

und neutraler Aminosäuren (bis Phe) werden ca. 1 nMol, für die Bestimmung der basischen Aminosäuren ca. 2 nMole auf dem im Arbeitskreis von Bücher (Machleidt (29), Krejci, Machleidt (30)) entwickelten Aminosäureanalysator aufgetragen. Hydrolyseverluste, die besonders bei Tryptophan, Tyrosin und Serin auftreten, sind bei den Peptidanalysen nicht korrigiert worden; ebenfalls nicht die Verluste, die durch unvollständige Hydrolyse von Ile und Val zu beobachten sind. Unverständlicherweise gab es bei vier Peptiden (A VII, B V,I, B XII,II, C III) auch Hydrolyseverluste für Arginin.

In dieser Arbeit ist Cystein mit ^{14}C-N-Äthylmaleinimid umgesetzt worden. Wie sich aufgrund von Modellreaktionen (Glutathion) gezeigt hat, entsteht aus dem Reaktionsprodukt bei der salzsauren Hydrolyse größtenteils eine Verbindung (wahrscheinlich Cysteinbernsteinsäure), die in der Aminosäureanalyse kurz vor Asparaginsäure eluiert wird. In unterschiedlicher Ausbeute entsteht in einigen Fällen außerdem Cysteinsäure.

C. Ergebnisse und Diskussion

Um alle cysteinhaltigen tryptischen Peptide aufgrund einer radioaktiven Markierung isolieren zu können, wurden die Merkaptogruppen der GDH an die Doppelbindung von radioaktivem ^{14}C-N-Äthylmaleinimid (^{14}C-NEM) unter Bildung eines Thioäthers addiert.



Nach der tryptischen Spaltung läßt sich bei Kenntniß der spezifischen Radioaktivität des zugesetzten ^{14}C-NEM in dem Trypsinhydrolysat die konzentration der entstandenen N-Äthylsuccinimidreste bestimmen. Aus der Extinktion z.B. bei 288 nm und den bekannten Extinktionskoeffizienten bei dieser Wellenlänge für Tryptophan und Tyrosin (31) und aus dem bekannten Gehalt der GDH an diesen beiden Aminosäuren läßt sich auch die Konzentration der Peptide berechnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Markierung und tryptischer Spaltung eine Konzentration an N-Äthylsuccinimidresten von 7,264 x 10^{-6} Vale pro ml und eine Peptidkonzentration von 2 x 0,378 x 10^{-6} Mole pro ml gefunden - entsprechend 0,378 µMole GDH pro ml. Unter der Voraussetzung, daß das ^{14}C-NEM aus-

schließlich mit Merkaptogruppen reagiert hat, errechnet sich daraus eine Zahl von 19,22 Valen Merkaptogruppen pro Mol GDH (bezogen auf 4 Tryptophane und 8 Tyrosine). Nach den Untersuchungen von Otto (15) und Brosemer (14) ist es sehr wahrscheinlich, daß die GDH aus zwei identischen Untereinheiten besteht. Daraus folgt eine Geradzahligkeit für alle Aminosäurereste in diesem Enzym. Aus den Bestimmungen mit DTNB (siehe unter B II.) und dem hier bestimmten Wert kann man unter Berücksichtigung der Geradzahligkeit auf einen Cysteingehalt von 20 in der GDH des Kaninchenmuskels schließen. Für diesen Fall wäre die Addition der Merkaptogruppen an das NEM zu 96,1 % erfolgt, wenn nicht noch andere Aminosäurereste mit dem NEM reagiert haben.

Wenn die Vermutung richtig ist, daß dieses Enzym aus zwei identischen oder fast identischen Untereinheiten besteht, sollte man bei tryptischer Spaltung maximal 10 cysteinhaltige Peptide erhalten. Für den Fall, daß mehrere Cysteine in einem tryptischen Peptid enthalten sind, erniedrigt sich die Zahl der Peptide; umgekehrt erhöht sie sich bei zusätzlich unspezifischer oder bei unvollständiger Spaltung.

Zur Isolierung der Peptide wurde nach tryptischer Spaltung auf einem Molekularsieb vorfraktioniert. Bei diesem Schritt können keine diskreten Fraktionen erwartet werden, weil die Molekülgrößen zu kleine Intervalle haben. Deshalb wurden die Fraktionen zunächst nach den Absorptionsmaxima bei 280 bzw. 289 nm geschnitten (Abb. 8). Zur Orientierung wurden Aliquots der dabei erhaltenen Fraktionen A bis E zunächst auf Kieselgel-Dünnschicht-Platten chromatographiert (Abb. 8). Dieses Zwischenergebnis zeigt nicht nur die wirkliche Komplexität der einzelnen Fraktionen, sondern es erlaubt nach Anfärbung der tryptophanhaltigen Peptide mit Ehrlichs Reagenz (32) und aller Peptide mit Ninhydrin und schließlich nach Auszählen der radioaktiven (^{14}C-NEM-umgesetzten) cysteinhaltigen Peptide folgende Aussagen:

1.) In der Fraktion A sollten mindestens 8 Peptide enthalten sein; davon sollten mindestens vier cysteinhaltig sein.
2.) Die Fraktion B sollte mindestens 10 Peptide enthalten, darunter vier cysteinhaltige und ein tryptophanhaltiges.
3.) Die Fraktion C sollte mindestens 12 Peptide - vier cystein- und ein tryptophanhaltiges enthalten, wobei der Tryptophanrest auch in einem cysteinhaltigen Peptid sein kann.
4.) Die Fraktion D sollte ebenfalls mindestens 12 Peptide enthalten, von denen zwei cysteinhaltig sein sollten.
5.) Die Fraktion E schließlich sollte mindestens 5 Peptide oder freie Aminosäuren enthalten, wobei eines Tryptophan und eines Cystein enthalten sollte.

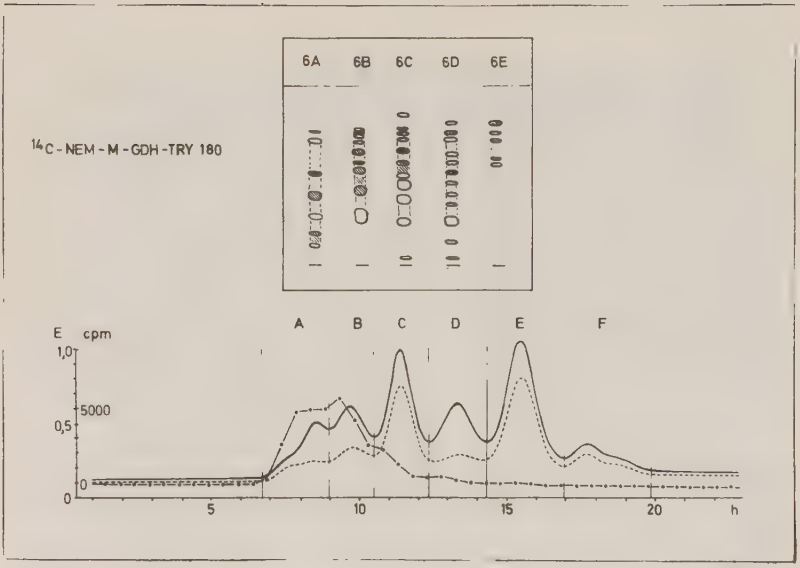


Abb. 8: Chromatogramm der Vorfraktionierung der tryptischen Peptide der GDH über Sephadex G 25 und dünnschichtchromatographische Analyse der einzelnen Fraktionen auf Kieselgel.

Fraktion	Zahl der Pept.	Zahl der radioaktiven Peptide	Zahl der tryptophanhaltigen Pept.
A	≤ 8	≤ 4	---
B	≤ 10	≤ 4	≤ 1
C	≤ 12	≤ 4	≤ 1
D	≤ 12	≤ 2	---
E	≤ 5	≤ 1	≤ 1

Tabelle III: Übersicht über die, aus der dünnschichtchromatographischen Analyse zu erwartenden Peptide.

Bei dieser Zusammenstellung muß man berücksichtigen, daß benachbarte Fraktionen möglicherweise dasselbe Peptid enthalten. Dadurch vermindert sich die Zahl von 47 Peptiden sicher. Das trifft nicht zu für die tryptophanhaltigen Peptide, weil sich die Rf-Werte in der Dünnschichtchromatographie deutlich unterscheiden. Obwohl die GDH nur zwei Tryptophane enthält, werden demnach drei typtophanhaltige Peptide zu erwarten sein; mindestens eines wird durch unspezifische oder unvollständige Spaltung entstanden sein.

Zur weiteren Auftrennung der Peptide wurden die Fraktionen A bis E einzeln auf QAE-Sephadex-Anionenaustauschersäulen chromatographiert. Im Gegensatz zur Gelchromatographie wurde in diesen Fällen die Absorption bei 224 nm registriert, einer Wellenlänge, bei der alle Peptide aufgrund der Absorption durch die Peptidbindung nachgewiesen werden können. Anschließend wurde die Radioaktivität in jeder Fraktion bestimmt (Abb. 9).

Diese von Machleidt (27) entwickelte, weitgehend automatische Peptidchromatographie für Mengen von 10 bis 200 x 10^{-9} Mole wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal in einer größeren zusammenhängenden Fragestellung angewandt.

Von kleineren Erhebungen der Basislinie abgesehen, zeigt das Chromatogramm der Fraktion A sechs Absorptionsgipfel und erwartungsgemäß vier deutliche Radioaktivitätsgipfel. Obwohl diese Peaks isoliert stehen und deswegen eine große Reinheit erwarten ließen, mußte erst die Aminosäureanalyse darüber endgültig Auskunft geben, ob ein möglichst ganzzahliges Verhältnis der Molzahlen aller im Peptid enthaltenen

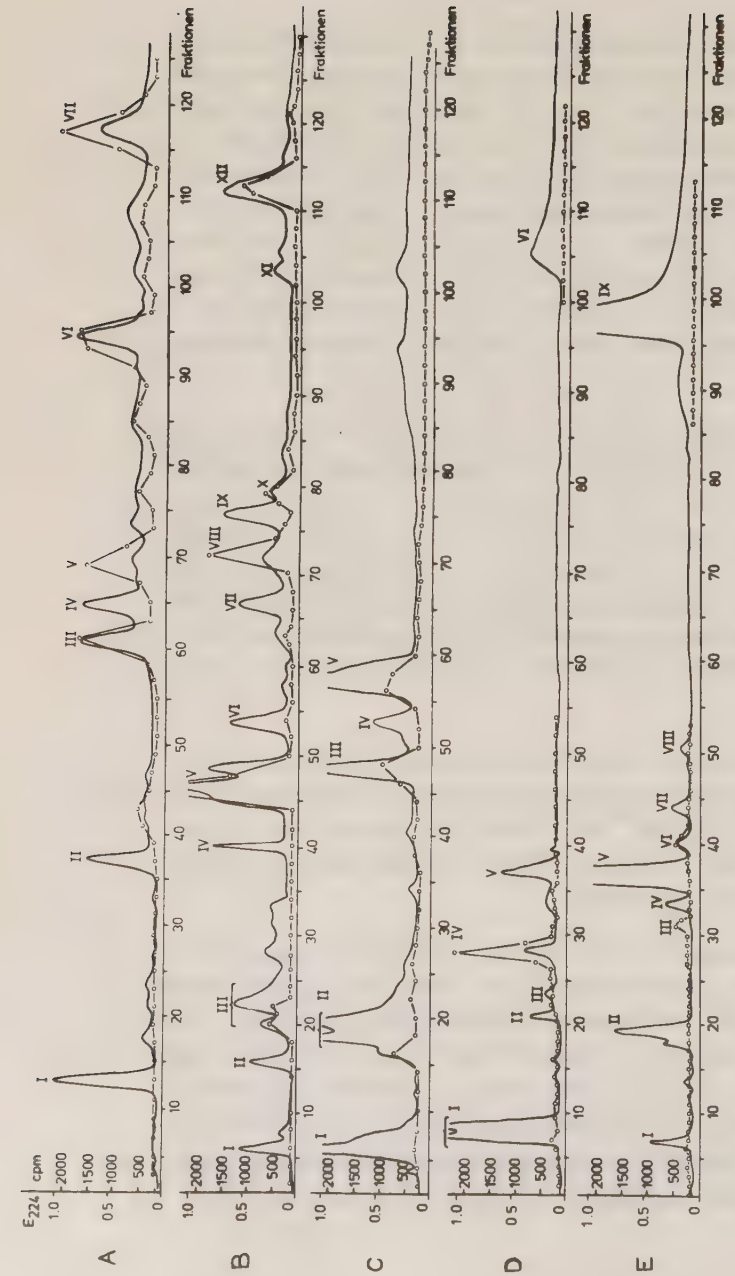


Abb. 9: Chromatogramme der tryptischen Peptide der Fraktionen A bis E auf QAE-Sephadex. Abszisse: Zahl der Fraktionen nach Elutionsbeginn (1 Fraktion = 30 min); Ordinate: Extinktion bei 224 nm ——, bzw. Radioaktivität in Imp./min pro Fraktion o—o—o.

Aminosäuren den Schluß auf Reinheit des Peptides zuließ. Nach Entsalzung der Fraktionen auf einem Molekularsieb wurden für diese Bestimmung ca. 3 x 10^{-9} Mole Peptid nach salzsaurer Hydrolyse auf dem ebenfalls im Arbeitskreis Bücher (Machleidt (29); Krejci und Machleidt (30)) entwickelten Aminosäureanalysator eingesetzt.

Für die mit I bis VII bezeichneten Peaks der Fraktion A wurden folgende Analysenergebnisse gefunden:

Fraktion A I: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1,12 nMole*

Asx	1	1,39	
Pro	2	2,17	
Ala	1	0,82	
Val	2	1,90	8 Aminosäuren
Gly	0	0,61	
Leu	1	0,93	
Lys	1	1,19	

* Die Angaben über die eingesetzten Mengen beziehen sich auf die Analysen der sauren und neutralen Aminosäuren. Für die Bestimmung der Aminosäuren Tryptophan bis Arginin wurde immer die doppelte Menge Hydrolysat verwendet.

Fraktion A II: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 0,65 nMole

Asx	2	2,39	
Thr	2	2,00	
Glx	3	3,41	
Gly	1	0,82	
Val	1	0,98	13 Aminosäuren
Ile	1	0,91	
Leu	1	1,16	
His	1	1,04	
Lys	1	0,79	

Fraktion A III: radioaktiv, eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1,10 nMole

Asx	3	3,07	
Thr	1	0,85	
Ser	0-1	0,42	
Glx	1	0,89	
Gly	3	3,45	
Ala	2	1,88	16-17 Aminosäuren
Val	1	1,24	
Ile	1	0,63	
Leu	1	0,99	
Phe	1	1,19	
Cys*	1	1,10	
Lys	1	0,81	

Cys* wurde als ein Reaktionsprodukt in der Aminosäureanalyse bestimmt (siehe unter B IV 3).

Faktion A IV: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1,56 nMole

Asx	2	2,13	
Thr	1	1,00	
Ser	2-3	2,40	
Glx	3-4	3,66	
Ala	2	1,89	
Val	1	1,31	
Ile	2	1,69	23-26 Aminosäuren
Pro	1	1,00	
Gly	3	3,49	
Leu	2	2,39	
Tyr	1	0,53	
Phe	1	0,70	
His	0-1	0,59	
Lys	1	1,17	
Arg	1	1,04	

Um die Frage zu beantworten, ob diese lysin- und argininhaltige Fraktion ein ditryptisches Peptid oder zwei tryptische Peptide enthält, wurde auf SP-Sephadex rechromatographiert. Dabei konnte nur ein lysinhaltiges Peptid isoliert werden (Fraktion A IV,I). Die Analyse des argininhaltigen Peptides war deswegen nur indirekt durch Subtraktion von A IV und A IV,I zu erhalten. Fraktion A IV,I: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1,37 nMole.

	A IV	A IV,I		A IV - A IV,I
Asx	2	1	1,06	1
Thr	1	1	0,88	
Ser	2-3			2-3
Glx	3-4	2	2,02	1-2
Ala	2			2
Val	1	1	0,95	
Ile	2			2
Pro	1			1
Gly	1			1
Leu	2			2
Tyr	1			1
Phe	1			1
His	0-1	1	1,12	
Lys	1	1	0,98	
Arg	1			1
		7 Aminosäuren		15-17 Aminosäuren

Fraktion A V: radioaktiv, eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 0,61 nMole

Thr	1	1,09	
Glx	1	1,17	
Gly	1	1,34	
Cys*	2	2,00	8 Aminosäuren
Ile	1	0,69	
Phe	1	0,94	
Lys	1	0,76	

Fraktion A VI: radioaktiv, eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 0,58 nMole

Asx	1	1,00	
Thr	2	1,58	
Ser	1	0,98	
Glx	2	2,13	
Gly	1	1,36	
Ala	1	1,08	16 Aminosäuren
Cys*	2	2,05	
Val	2	2,17	
Ile	2	1,63	
Leu	1	0,96	
Lys	1	1,03	

Bei der Entsalzung der Fraktion VII traten zwei Absorptionsgipfel auf, die getrennt analysiert wurden:

Fraktion A VII a: radioaktiv, eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1 bzw. 0,81 nMole

Asx	1	0,91; 1,00	
Thr	2	1,52; 1,63	
Ser	1	0,98; 1,06	
Glx	1	1,16; 1,27	
Gly	1	1,13; 1,06	
Ala	1	0,98; 0,88	14-15 Amino-
Cys*	2	1,82; 2,07	säuren
Val	1	1,15; 1,05	
Ile	1	0,85; 0,99	
Leu	1-2	1,51; 1,58	
Tyr	1	0,66; 0,51	
Arg	1	0,65; 0,89	

Fraktion A VII b: radioaktiv, eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1,97 nMole

Thr	1	0,87	
Cys*	1	0,99	3 Aminosäuren
Arg	1	1,14	

Die Fraktion B I zeigte zunächst keine Aminosäureanalyse, die ein einheitliches Peptid erwarten lassen konnte. Deshalb wurde nach der Entsalzung auf SP-Sephadex rechromatographiert. Die Analysen ergaben:

Fraktion B I,I: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 0,4 nMole

Asx	1	0,88	
Ser	1	0,81	
Gly	1	1,09	
Ala	1	1,44	8 Aminosäuren
Ile	2	2,27	
Leu	1	0,99	
Lys	1	0,96	

Fraktion B I,II: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1,78 nMole

Thr	1	0,94	
Glx	1	1,54	
Pro	1	1,03	
Gly	1	1,13	7 Aminosäuren
Ala	1	0,98	
Leu	1	0,99	
Arg	1	0,94	

Fraktion B I,III: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 3,1 nMole

Ser	1	0,72	
Gly	1	0,95	
Ala	1	1,34	5 Aminosäuren
Ile	1	0,83	
Lys	1	1,01	

Dieses Peptid enthält ausserdem ca. 15 % der Fraktion B I,II als Verunreinigung.

Fraktion B II: eingesetzte Menge in der Aminosäure-analyse: 1,46 nMole

Asx	1-2	1,76	
Pro	2	2,03	
Ala	1	1,03	8-9 Aminosäuren
Val	2	2,46	
Leu	1	0,94	
Lys	1	0,79	

Die Fraktion B III ließ bereits aus dem QAE-Sephadex-Chromatogramm erkennen, daß sie nicht einheitlich ist, so daß eine SP-Sephadex-Rechromatographie angeschlossen werden mußte. Zwei der resultierenden Peaks zeigten folgende Analysen:

Fraktion B III,II: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 0,82 bzw. 1,64 nMole

Asx	1	0,98	
Glx	3	2,92	
Gly	1	1,09	9 Aminosäuren
Ala	1	0,99	
Leu	2	1,98	
Lys	1	1,04	

Fraktion B III,IV: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1,28 nMole

Asx	1	1,10	
Pro	1	1,02	
Gly	1	1,04	
Leu	2	1,94	8 Aminosäuren
Phe	1	1,04	
Val	1	0,88	
Lys	1	0,99	

Die ebenfalls angefallenen Fraktionen B III,I und B III,III wurden in zu geringer Ausbeute erhalten.

Fraktion B IV: eingesetzte Menge in der Aminosäure-analyse: 2,51 nMole

Asx	1	1,47	
Thr	1	1,04	
Glx	2	2,13	
Val	0-1	0,67	8-9 Aminosäuren
Ile	1	0,83	
Leu	1	0,80	
His	1	1,02	
Lys	1	1,03	

Auch die Fraktion B V mußte rechromatographiert werden. Die Rechromatographie ergab zwei Hauptfraktionen, von denen eine radioaktiv war.

Fraktion B V,I: radioaktiv, eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1 bzw. 2 nMole

Asx	1	1,41	
Thr	1	1,06	
Ser	1	1,12	
Glx	2	1,89	
Pro	2	2,23	
Gly	1	1,52	15 Aminosäuren
Ala	1	1,29	
Cys*	1	1,00	
Val	1	0,93	
Met	1	0,80	
Leu	1-2	1,54	
Phe	0-1	0,61	
Arg	1	0,28	

Fraktion B V,II: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1 bzw. 2 nMole

Asx	1	1,04	
Ser	1	0,77	
Glx	3	2,85	
Pro	1	0,94	
Gly	1	1,64	12 Aminosäuren
Val	1	1,01	
Ile	1	0,91	
Leu	1	0,91	
Lys	2	2,00	

Die Fraktion B VI wurde ebenfalls rechromatographiert und enthält als Hauptbestandteil folgendes Peptid:

Fraktion B VI,II: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1,42 bzw. 2,84 nMole

Ser	1	0,96	
Glx	1	1,18	
Ile	1	0,78	6 Aminosäuren
Leu	2	1,90	
His	1	1,18	

Fraktion B VII ergab noch keine Analyse, die auf ein reines Peptid zu schließen erlaubte, so daß eine Rechromatographie angeschlossen werden müßte. Trotzdem erkennt man, daß dieses Peptid sicher durch das Peptid aus der Fraktion A mit ähnlichem Rf-Wert (A III) verunreinigt ist - etwa im Verhältnis 1:0,36.

Fraktion B VII: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 0,97 bzw. 1,94 nMole

	Gesamtanalyse	- 0,36 A III		
Asx	1,10	0-1	0,74	
Thr	0,31	-		
Ser	1,96	2	1,60-1,96	
Glx	3,30	3	2,94	
Pro	2,01	2	2,01	
Gly	4,50	3	3,42	
Ala	0,58	-		23-24
Cys*	0,43	-		Aminosäuren
Val	1,55	1	1,19	
Met	1,13	1	1,13	
Ile	4,89	5	4,53	
Leu	4,42	4	4,06	
Phe	0,31	-		
Lys	0,39	-		
His	2,08	2	2,08	

Fraktion B VIII: radioaktiv, eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1,21 bzw. 2,24 nMole

Thr	1	1,26	
Glx	1	1,30	
Gly	1	0,98	
Cys*	2	1,81	8 Aminosäuren
Ile	1	1,02	
Phe	1	0,72	
Lys	1	0,92	

Die Fraktion B IX mußte nach der ersten Aminosäureanalyse ebenfalls rechromatographiert werden. Als Beispiel soll an dieser Fraktion die Aminosäurezusammensetzung vor und nach der Rechromatographie gezeigt werden:

Fraktion B IX und B IX,I: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 0,95 bzw. 1,90 nMole

	B IX	B IX,I		
Asx	1,72	1	1,13	
Glx	2,03	2	2,07	
Gly	2,00	2	1,93	
Ala	1,63	-		
Val	0,93	1	0,79	9 Amino-
Ile	1,49	1	1,03	säuren
Leu	0,59	-		
Phe	0,96	1	0,83	
Lys	1,04	1	1,22	

Aus der radioaktiven Fraktion B X konnte bisher kein einheitliches Peptid isoliert werden. Wahrscheinlich beinhaltet sie ein argininhaltiges Peptid, in dem u. a. Methionin und Histidin vertreten sind. Cystein aber konnte nur in Spuren nachgewiesen werden.

Fraktion B XII erbrachte nach Rechromatographie folgende Analyse:

Fraktion B XII, II: radioaktiv, eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1 bzw. 2 nMole

Glx	2	2,60	
Pro	1	1,09	
Gly	1	1,51	
Cys*	1	1,00	9-10 Aminosäuren
Val	1-2	1,56	
Tyr	1	0,75	
Phe	1	0,80	
Arg	0-1	0,34	

Aus der Fraktion B konnten insgesamt 14 Peptide isoliert werden. Zwei von ihnen enthalten weder Lysin Arginin, so daß auch sie Fragmente tryptischer Peptide

sein müßten. Das Peptid B VII jedoch kommt auch als C-terminales Peptid der GDH in Frage, da es Methionin und Histidin enthält. Brosemer (14) nämlich hat durch Behandlung der GDH mit Carboxypeptidase A nachgewiesen, daß der C-Terminus dieses Proteins Methionin und die vorletzte Aminosäure wahrscheinlich Histidin ist. Otto (15) hatte ein ähnliches Peptid isoliert, das zwar Methionin und Histidin, aber weder Lysin noch Arginin enthielt. Es unterscheidet sich von diesem im Wesentlichen dadurch, daß es Prolin nur in sehr geringen Mengen, zusätzlich aber Threonin enthält. Erstaunlich an dem Peptid B VII ist vor allem, daß es als vermutlich größtes tryptisches Peptid der GDH erst in der B-Fraktion der Gelchromatographie eluiert wurde. Als weiteres Peptid fällt B VI,II mit nur 6 Aminosäuren etwas aus dem Rahmen der Hepta- bis Tredecapeptide. Bei diesem Peptid fehlen jedoch die Bezugsgrößen Lysin oder Arginin als Einheit, so daß dieses Peptid mit dem doppelten Molekulargewicht als Dodecapeptid in diesen Rahmen passen würde. Von den fünf Radioaktivitätspeaks konnten nur aus den dreien mit der höchsten Aktivität cysteinhaltige Peptide isoliert werden. Erwartungsgemäß ist aber das Peptid B VIII sicher identisch mit dem cysteinhaltigen Peptid A V, so daß nur zwei neue cysteinhaltige Peptide aus der B-Fraktion gewonnen werden konnten. Identisch sind offenbar auch die Peptide B II und A I, sowie eventuell B IV und A II, denn sowohl die Rf-Werte der QAE-Sephadex-Chromatographie als auch die Aminosäureanalysen stimmen überein, bzw. sind die Aminosäuren der Fraktion B IV in der Fraktion A II enthalten. Das könnte bedeuten, daß A II nicht rein, oder B IV ein Fragment von A II ist. Das Peptid B IX,I hat außerdem eine identische Amino-

säureanalyse mit dem von Otto (15) isolierten und bereits sequenzierten Nonapeptid V:

Val Phe Glu Glu Asp Ile Gly Gly Lys

Die Fraktion B I,III schließlich scheint erst nach der Gelchromatographie aus dem Peptid B I,I entstanden zu sein, weil sie als Pentapeptid in dieser Fraktion nicht auftreten dürfte.
Die Dünnschichtchromatographie der Fraktion B hatte nach Anfärbung mit Ehrlichs Reagenz ein tryptophanhaltiges Peptid gezeigt. Ein solches Peptid konnte nach der Säulenchromatographie nicht gefunden werden.

Das Anionenaustauscherchromatogramm der Fraktion C zeigt, daß in dieser Fraktion mindestens sieben Peptide enthalten sind und , wie man aus dem Extinktionsquotienten bei 280/289 nm erkennt, daß eines der drei in ihr enthaltenen radioaktiven Peptide, C V, gleichzeitig Tryptophan enthält. Leider ist durch ein technisches Versehen der größte Teil der Fraktion C verloren gegangen. Aus den geringen Mengen, die für einen Testlauf verwendet worden waren ließen sich dennoch einige Analysen anfertigen.

Aus der Fraktion C I konnte nach Rechromatographie auf SP-Sephadex ein Oktapeptid isoliert werden:

Fraktion C I,IV: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1,11 nMole

Ser	1	0,98	
Glx	1	1,21	
Pro	1	0,95	
Gly	1	1,64	8Aminosäuren
Ala	2	2,34	
Ile	1	1,02	
Lys	1	0,93	

Fraktion C III: radioaktiv, eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1,2 nMole

Asx	1	1,05	
Ser	0	0,59	
Glx	2	2,16	
Pro	1	0,86	
Cys*	1	0,98	10 Aminosäuren
Ile	0	0,33	
Leu	2	1,76	
His	2	2,20	
Arg	0-1	0,43	

Aus den übrigen Fraktionen einschließlich der interessanten Fraktion C V konnten leider keine ausreichenden Peptidmengen für eine Aminosäureanalyse gewonnen werden. Neben dem Tryptophan hätte vor allem die Radioaktivität interessiert, nachdem bereits 10 Cysteine in sieben tryptischen Peptiden nachgewiesen wurden.

Aufgrund des Extinktionsquotienten bei 280/289 nm läßt das Chromatogramm der Anionenaustauscherchromatographie in der Fraktion D drei tryptophanhaltige Peptide vermuten, von denen D I außerdem Tyrosin enthalten sollte. Die Analyse bestätigt diese Voraussage:

Fraktion D I,III: eingesetzte Menge in der Aminosäureanalyse: 1,39 nMole

Ala	1	1,02	
Val	1	0,79	
Tyr	1	0,49	5 Aminosäuren
Trp	1	0,31	
Lys	1	1,18	

Fraktion D IV: eingestzte Menge in der Aminosäure-analyse: 1,77 nMole

Ala	O-1	O,67	
Ile	O-1	O,58	
Phe	1	O,87	2-4 Aminosäuren
Arg	1	1,OO	

Fraktion D V: eingesetzte Menge in der Aminosäure-analyse: 3,15 nMole

Ala	2	1,94	
Val	1	1,16	
Met	1	1,12	
Tyr	1	1,03	8 Aminosäuren
Phe	1	O,5O	
Trp	1	O,26	
Lys	1	O,75	

Fraktion D VI: eingesetzte Menge in der Aminosäure-analyse: 1,4 nMole

Thr	1	O,88	
Val	1	1,4O	4 Aminosäuren
Met	1	O,73	
Trp	1	+	

Erwartungsgemäß sind nicht alle drei tryptophanhaltigen Peptide tryptische Peptide. D VI enthält weder Lysin noch Arginin und ist folglich ein Fragment eines tryptischen Peptides - eventuell durch eine chymotryptische Restaktivität des Trypsins entstanden: denn die spätere Sequenzierung hat gezeigt, daß das Tryptophan C-terminal steht: Val Thr Met Trp. Die beiden anderen tryptophanhaltigen Peptide D I,III und D V enthalten zwar Lysin, doch können sie nicht das Mutterpeptid von D VI sein, weil in beiden kein Threonin vorkommt. Andererseits kanndie Aminosäure-

analyse von D V die von D I,III beinhalten, so daß D I,III sicher ein Fragment von D V ist, da ja nur zwei verschiedene tryptische Tryptophanpeptide in der GDH existieren können.
Schließlich ist in der Fraktion D das Peptid D IV isoliert worden, das noch keine eindeutige Analyse ergeben hat. Jedoch scheint es mit dem bereits von Otto (15) isolierten Dipeptid B_2 Phe Arg identisch zu sein.
Außerdem wurde in der Fraktion D II Tyrosin und Tryptophan nachgewiesen. Ob sie als freie Aminosäuren oder als Fragment der Fraktion D V vorlagen, wurde nicht untersucht.

Die Fraktion E der Gelfiltration hat bisher nur eine Peptidanalyse erbracht, und zwar von E IX. Dieses Peptid ist identisch mit der Fraktion D VI. Die Fraktion E II enthält, wie die Fraktion D II, Tyrosin und Tryptophan. Im übrigen wurden nur freie Aminosäuren nachgewiesen:

E IV: Isoleucin
E VI: Lysin

Frakt.	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Cys	*Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Trp	Lys	His	Arg	Summe
A I	1				2		1		2			1				1			8
II	2	2		3		1			1		1	1				1	1		13
III	3	1	O-1	1		3	2	1	1		1	1		1		1			16
IV,I	1	1		2					1							1	1		7
IV-IV,I	1		2-3	1-2	1	1	2				2	2	1	1				1	15-17
V		1		1		1		2			1			1		1			8
VI	1	2	1	2		1	1	2	2		2	1				1			16
VIIa	1	2	1	1		1	1	2	1		1	1-2	1					1	14-15
B I,I	1		1			1	1				2	1				1			8
I,II		1		1	1	1	1					1						1	7
I,III			1			1	1				1					1			5
III,II	1			3		1	1					2				1			9
III,IV	1				1	1			1			2		1		1			8
V,I	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1		1		1				1	15
V,II	1		1	3	1	1			1		1	1				2			12
VII	O-1		2	3	2	3			1	1	5	4					2		23-24
IX	1			2		2			1		1			1		1			9
XII,II				2	1	1		1	1-2				1	1				1	9-10
C I,IV			1	1	1	1	2				1					1			8
III	1			2	1			1				2					2	1	10
D IV														1				1	2
V							2		1	1			1	1	1	1			8
VI		1							1	1					1				4
E VI																1			1
Summe	17-18	12	11-13	3o-31	13	22	16	10	16-17	4	19	21-22	4	9	2	16	6	7	235-241
Analyse	28	14	14	42	16	40	32	10	27	9	26	28	4	15	2	28	9	8	352

Tabelle IV: Zusammenstellung der in der vorliegenden Arbeit isolierten Peptide.

Die Zusammenstellung der isolierten Peptide (Tab. IV) zeigt, daß ca. 25 Peptide dargestellt werden konnten, von denen eventuell einige Fragmente anderer Peptide sind, wie z.B. D IV in B V,I oder A IV-IV,I enthalten sein kann. Das Peptid B V,II enthält zwei Lysine und ist wahrscheinlich ein ditryptisches Peptid, während B VII als mögliches C-terminales und D VI als chymotryptisches Fragment eines tryptischen Peptides weder Lysin noch Arginin enthalten.
Von 37 möglichen tryptischen Peptiden wurden ca. 24 erhalten. Auch die Zahl der Aminosäuren wurde etwa zu zwei Dritteln gefunden (ca. 280 von 352). Jedoch konnten die gesuchten 10 Cysteine in sieben Peptiden lokalisiert werden: A III, A V, A VI, A VIIa, B V,I, B XII,II und C III.

Das Peptid A III enthält wahrscheinlich das von Telegdi (8) beschriebene "reaktive" Cystein, denn nur dieses Peptid enthält neben Cystein auch alle anderen von Telegdi bestimmten Aminosäuren:

Telegdi: Phe Ala Val Thr Cys Ser Gly Glu -
A III: (Asx_2Gly Ala Phe Ala Val Thr Cys Ser_{0-1}Gly Glu -

- Gly Ile Val Leu Lys
- Gly Ile Leu Lys)

Ob das Peptid 1 oder 2 Valine enthält, ist bei Telegdi nicht völlig klar (8), aber auch in dieser Analyse wäre bei unzureichender Hydrolyse des Bereiches Ile Val Leu eine Ausbeute von 0,62 noch möglich.

Neben den cysteinhaltigen Peptiden wurden alle vier Tyrosine in tryptischen Peptiden lokalisiert. Auch beide Tryptophane wurden gefunden, jedoch eines nur in einem chymotryptischen Fragment eines tryptischen

Peptides.
Leider läßt sich mit den hier beschriebenen Ergebnissen beim Vergleich mit den drei bereits sequenzierten Transhydrogenasen ADH (11), GAPDH (9,10) und GluDH (12) keine Aussage machen über eine eventuelle Verwandtschaft dieser Proteine. Die Peptide mit dem besonders konservativen Tryptophan sollen nämlich am ehesten Ähnlichkeiten erwarten lassen:

ADH aus	(10)	Lys Ala Ala Val Leu Trp Glu Glu Lys Lys Pro
Pferde-Leber	(309)	Leu Ser Gly Arg Thr Trp Lys Gly Ala Ile Phe
GAPDH aus	(79)	Pro Ala Asn Ile Lys Trp Gly Asp Ala Gly Thr
Schweine-	(188)	Pro Ser Gly Lys Leu Trp Arg Asp Gly Arg Gly
Muskel	(305)	Val Lys Leu Ile Ser Trp Tyr Asp Asn Glu Phe
GluDH aus	(66)	Arg Asp Asp Gly Ser Trp Glu Val Ile Glu Gly
Rinder-	(173)	Glu Arg Glu Met Ser Trp Ile Ala Asp Thr Tyr
Leber	(276)	Ser Asp Gly Ser Ile Trp Asn Pro Asp Gly Ile
GDH aus	(D V)	(Ala Ala Val Phe Trp Met Tyr Lys)
Kaninchen-	(D VI)	Val Met Thr Trp
Muskel		

Allenfalls das Peptid D V könnte homologe Sequenzen zur Alkoholdehydrogenase (11-19) haben.
Apitz (33) vermutet, daß ein oder zwei Histidinreste am Aktivitätszentrum der GDH beteiligt sind. Wenn das ein allgemeines Prinzip der Transhydrogenasen sein sollte, wäre eventuell eine invariable Sequenz mit einem Histidinrest zu erwarten. Aber auch hier konnten keine auffälligen Homologien beobachtet werden.

D Zusammenfassung

1. Es wurde bestätigt, daß die a-Glycerophosphatdehydrogenase des Kaninchenmuskels 20 Cysteinreste enthält.

2. Nach radioaktiver Markierung wurden 756 nMole Untereinheit GDH tryptisch gespalten und durch Gel- und Ionenaustauscherchromatographie aufgetrennt. Dabei wurden
   a) sieben Peptide isoliert, die alle 10 Cysteinreste enthalten,
   b) vier Peptide isoliert, die alle 4 Tyrosinreste enthalten,
   c) zwei Peptide - ein tryptisches und ein chymotryptisches Fragment eines tryptischen Peptides - isoliert, die beide Tryptophane enthalten,
   d) eine Reihe von weiteren Peptiden - insgesamt ca. 24 - isoliert.

3. Die Isolierung der Peptide stützt die Beobachtungen von Brosemer (14) und Otto (15), daß die GDH aus zwei gleichen Untereinheiten besteht.

4. Erstmals wurde in dieser Arbeit die automatische Peptidchromatographie im Nanomolmaßstab (27) für die Lösung einer sehr komplexen Fragestellung angewendet.

E. Verzeichnis der Abkürzungen

Aminosäuren:	Ala	Alanin
	Asn	Asparagin
	Asp	Asparaginsäure
	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
	Arg	Arginin
	Cys	Cystein
	Gln	Glutamin
	Glu	Glutaminsäure
	Gly	Glycin
	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure
	His	Histidin
	Ile	Isoleucin
	Leu	Leucin
	Lys	Lysin
	Met	Methionin
	Phe	Phenylalanin
	Pro	Prolin
	Ser	Serin
	Thr	Threonin
	Trp	Tryptophan
	Tyr	Tyrosin
	Val	Valin
Enzyme:	ADH	Alkoholdehydrogenase
	GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
	GDH	Glycerophosphatdehydrogenase
	GluDH	Glutamatdehydrogenase
Coenzyme:	NAD	Nicotinsäureamidadenindinucleotid
	NADH	reduziertes NAD
Reagenzien:	DTE	Dithioerythrit
	DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
	NEM	N-Äthylmaleinimid

F Literaturverzeichnis

1.) Clark, B.F.C., Marcker, K.A. (1966) J. Mol. Biol. 17, 394-406

2.) Ando, K., Matsubara, H., Okunuki, K. (1965) Proc. Japan. Acad. 41, 79

3.) Holzer, H. (1952) Z. physiol. Chem. 291, 67

4.) Holbrook, J.J., Pfleiderer, G., Mella, K., Volz,M., Lescovac, V., Jeckel, R. (1967) Europ. J. Biochem. 1, 476-481

5.) Fondy, T.P., Everse, J., Driscoll, G.A., Castillo, F., Stolzenbock, F.E., Kaplan, N.O. (1965) J. Biol. Chem. 240, 4219-4234

6.) Harris, I. (1964) Nature 203, 30-34

7.) Perham, R.N., Harris, J.I. (1963) J. Mol. Biol. 7, 316-320

8.) Sajgo, M., Telegdi, M. (1968) Acta Biochim. Biophys. Hung. 3, 171-174

9.) Harris, J.I., Perham, R.N. (1968) Nature 219, 1025-

10.) Davidson, B.E., Sajgo, M., Noller, H.F., Harris, J.I. (1967) Nature 216, 1181-

11.) Jörnvall, H. (1970) Europ. J. Biochem. 16, 25-40

12.) Moon, K., Piszkiewicz, D., Smith, E. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1380-1383

13.) Eys, J. van, Judd, J., Ford, J.,Womack, W.B. (1964) Biochemistry 3, 1755-1763

14.) Brosemer, R.W., Kuhn, R.W. (1969) Biochemistry 8, 2095-2105

15.) Otto, J. (1970) Dissertation, München, Nat. Fak.

16.) Lehmann, F.G., Pfleiderer, G. (1968) Z. physiol. Chem. 349, 1777-1785

17.) Fondy, T.P., Ross, C.R., Sollohub, S.J. (1969) J. Biol. Chem. 244, 1631-1644

18.) Otto, J., Raggi, A., Machleidt, W., Bücher, Th. (1972) Z. physiol. Chem. 353, 332-344

19.) Ankel, H., Bücher, Th., Czok, R. (1960) biol. Z. 332, 315-327

20.) Eys, J. van, Nuenke, B.J., Patterson, M.K. (1959) J. Biol. Chem. 234, 2308-2313

21.) Scoffone, E., Fontana, A. (1970) S.B. Needleman Ed. Protein Sequence Determination, Springerverlag Berlin - Heidelberg - New York, 198-199

22.) Riordan, J.F., Vallee, B.L. (1967) Methods in Enzymol. 11, 545-548

23.) Riordan, J.F., Vallee, B.L. (1972) Methods in Enzymol. 25, 449-456

24.) Cohen, L.A. (1968) Ann. Rev. Biochem. 37, 695-726

25.) Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., Pfleiderer, G. (1953) Z. Naturforsch. 8b, 555-577

26.) Determann, H., Waller, J. (1968) Nature 219, 604-

27.) Machleidt, W., Kerner, W., Otto, J. (1970) Z. Anal. Chem. 252, 151-158

28.) Konigsberg, W. (1972) Methods in Enzymol. 25, 185-188

29.) Machleidt, W. (1968) Dissertation, München, Med. Fak.

30.) Krejci, K., Machleidt, W. (1969) Z. physiol. Cem. 350, 981-993

31.) Edelhoch, H. (1967) Biochemistry 6, 1948-1954

32.) Bailey, L. (1962) Tehniques in Protein Chemistry, Elsevier Publishing Comp., Amsterdam - London - New York

33.) Apitz-Castro, R., Suarez, Z. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198, 176-182

L e b e n s l a u f

Am 2. August 1946 wurde ich als Tochter des Technischen Amtsrates Leo Paletta und seiner Ehefrau Eleonore, geb. Kafka in Amberg/Opf. geboren.
1948 zogen meine Eltern nach München, wo ich im Herbst 1952 zur Volksschule kam. Ab 1956 besuchte ich das St. Anna Realgymnasium und anschließend das Sophie-Scholl-Realgymnasium, an dem ich im Juni 1965 die Reifeprüfung ablegte.
Im Wintersemester 1965/66 begann ich an der Ludwig Maximilians-Universität in München mit dem Studium der Biologie und Chemie für das Höhere Lehramt. Im Sommersemester 1966 wechselte ich in das Studienfach Medizin über. Mit dem Staatsexamen schloß ich mein Medizinstudium im Februar 1972 ab.
Die Experimente für die vorliegende Arbeit führte ich von November 1968 bis August 1971 unter Anleitung von Herrn Dr. Joachim Otto am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München aus.
Seit 1969 bin ich mit dem Diplomchemiker Dr. Klaus Harbers verheiratet.